

# ÖSSZEHASONLÍTÓ KARIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK A GYEPI BÉKA (*RANA TEMPORARIA*) ÉS AZ ERDEI BÉKA (*RANA DALMATINA*) KÖZÖTT

DR. BARTOS LÁSZLÓ–KORMOS DÉNES

(Közlésre érkezett: 1978. december 13.)

A sejtkariológia a kromoszómák vizsgálatával foglalkozó tudományág, amely napjainkban egyre nagyobb jelentőségre tett szert. Szinte nélkülözhetlenné vált a citotaxonomiai kutatásokban, mert a kariotípusok összehasonlításával lehetővé teszi a különböző élőlények pontosabb rendszertani hovatartozásának megállapítását. Különösen fontos ez a közeli rokon fajok, illetve ezek természetes úton létrejött hibridjeinek vizsgálatánál, mivel a fenotípusos differenciálás ilyen esetekben nehézségekbe ütközik.

Nem véletlen tehát, hogy az utóbbi időben a nemzetközi zoológiai irodalomban is nagy érdeklődés kíséri a közeli rokon fajcsoportok problémájára való rávilágítást, amelynek megoldásában a kariológia igen eredményesen felhasználható. Tudjuk, hogy ma már szinte nem létezik olyan szisztematikai probléma, amit a kromoszómák vizsgálata nélkül teljes biztonsággal el lehetne dönteni. Bizonyítja ezt az a tény is, hogy napjainkig a botanikában kb. 50 000 növényfaj kariológiai adatai váltak ismertté, de az állatvilágban sem kevesebb ma már az ismert kariotípusok száma.

Annak ellenére, hogy a kariológia gyökerei valójában a múlt századba nyúlnak vissza, mai modern formájában csak 1960 óta ismeretes. Fejlődését nagymértékben elősegítette, hogy NOWELL (1960) felfedezte a fitohemagglutinin, és ennek a sejtosztódást serkentő anyagnak az alkalmazása új, az eddiginél eredményesebb kromoszóma preparálási módszer kidolgozását tette lehetővé. Emellett nagy jelentőségű volt még a LEVAN, FREDGA és SANDBERG (1964) által javasolt új nomenklatúra a centromerek helyzete alapján, ami lehetővé teszi a kariológiában az egyes kariotípusok egzaktabb összehasonlítását.

Vizsgálataink tárgyaként azért választottuk a Kétéltűeket, mert közöttük több esetben is találkozhatunk a fent említett közeli rokon fajok problémáival. Példaként említjük a közelmúltban nemzetközileg is nagy figyelemmel kísért *Rana esculenta* – formakörrel kapcsolatosan felmerült kérdéseket, amelyekkel egy korábbi tanulmányunkban már foglalkoztunk. (MÉSZÁROS és BARTOS 1978.) Ugyanakkor a Kétéltűek kromoszómainak viszonylag nagy mérete és kis száma olyan ismeretek gyűjtését teszi lehetővé, amelyeket később más, hasonló eseteknél is sikeresen alkalmazhatunk.

## *Anyag és módszer*

A békát a sejtosztódás felfüggesztése céljából intraperitoneálisan beinjekcióztuk 0,04%-os kolchicin-oldattal. Ezután 20–22 °C-on tartottuk 32–44 órán keresztül, majd dekapitáltuk és kipeparáltuk a csöves csontokat. Ez utóbbiakból injekcióstű és fecskendő

segítségével kimostuk a vörös csontvelőt, mivel benne igen gyakoriak az osztódások. A kapott anyagot centrifuga-csővekbe vittük és kb. 15–20 percig desztillált vízzel hipotonizáltuk, majd 700-as fordulaton 10 percig centrifugáltuk. Ezt követően a felülúszót leszívattuk, és ismét hipotonizáltunk, illetve centrifugáltunk. Másodszor is leszívattuk a felülúszót és helyébe a fixálószerből (metanol és jégcet 3:1 arányú keveréke) 5 ml-t vittünk óvatosan az anyagra, majd 25–30 percig vártunk. Ezután újból centrifugálás és leszívás következett, végezetül ugyanezt a műveletet megismételtük, de most kimaradt a hosszú fixálási idő. A visszamaradt anyagot előzőleg lehűtött tárgylemezek felületén egyenletesen elosztottuk, majd foszfátpufferrel 6,8–7 pH-ra beállított 5%-os Giemsa-oldattal kb. 20–25 percig megfestettük. Megjegyezzük, hogy ez a módszer csak homogén festést ad, a sávozást jól kivehetően így nem lehet észlelni. Végezetül a kromoszómagarnitúrákat zöld színszűrővel és mikrofotografáló-berendezés segítségével lefényképeztük, majd meghatároztuk a kariotípust.

### *A kariotípus meghatározása*

A két vizsgált békafaj kariotípusát a kromoszómákról készített fényképek segítségével határoztuk meg. *Kariotípuson* a kromoszómákat megkülönböztető sajátosságok azon csoportját értjük, melynek segítségével egy-egy adott kromoszómasorozatot jellemezni lehet. Megállapításához a következő adatokat használjuk:

*Kariogram*: megadja az egy sejtből található kromoszómák számát és típusát (beleértve a rendelleneseket is).

*Idiogram*: akkor kapjuk, ha az adott kromoszómagarnitúra homológ párjait csökkenő méretüknek megfelelően sorba rendezzük.

A kromoszómák alakja és típusa igen fontos bélyeg, amely a kromoszómagarnitúrában pontos felismerésüket lehetővé teszi. Az egyes kromoszómákat az alábbi adatokkal jellemezhetjük:

1. *Kararány (H/R)*: a hosszú (*l*) és a rövid (*s*) kar hányadosaként adható meg.

2. *Centromer-index (ci)*: a centromer helyzetének megjelölésére szolgál, az alábbi összefüggéssel lehet meghatározni:

$$ci = \frac{100 \cdot s}{c}$$

ahol *c* = a kromoszóma teljes hossza (*l* + *s*).

3. *Relatív hossz*: megadja, hogy az adott kromoszóma teljes hossza hány %-át alkotja a vizsgált kromoszómagarnitúra összhosszának.

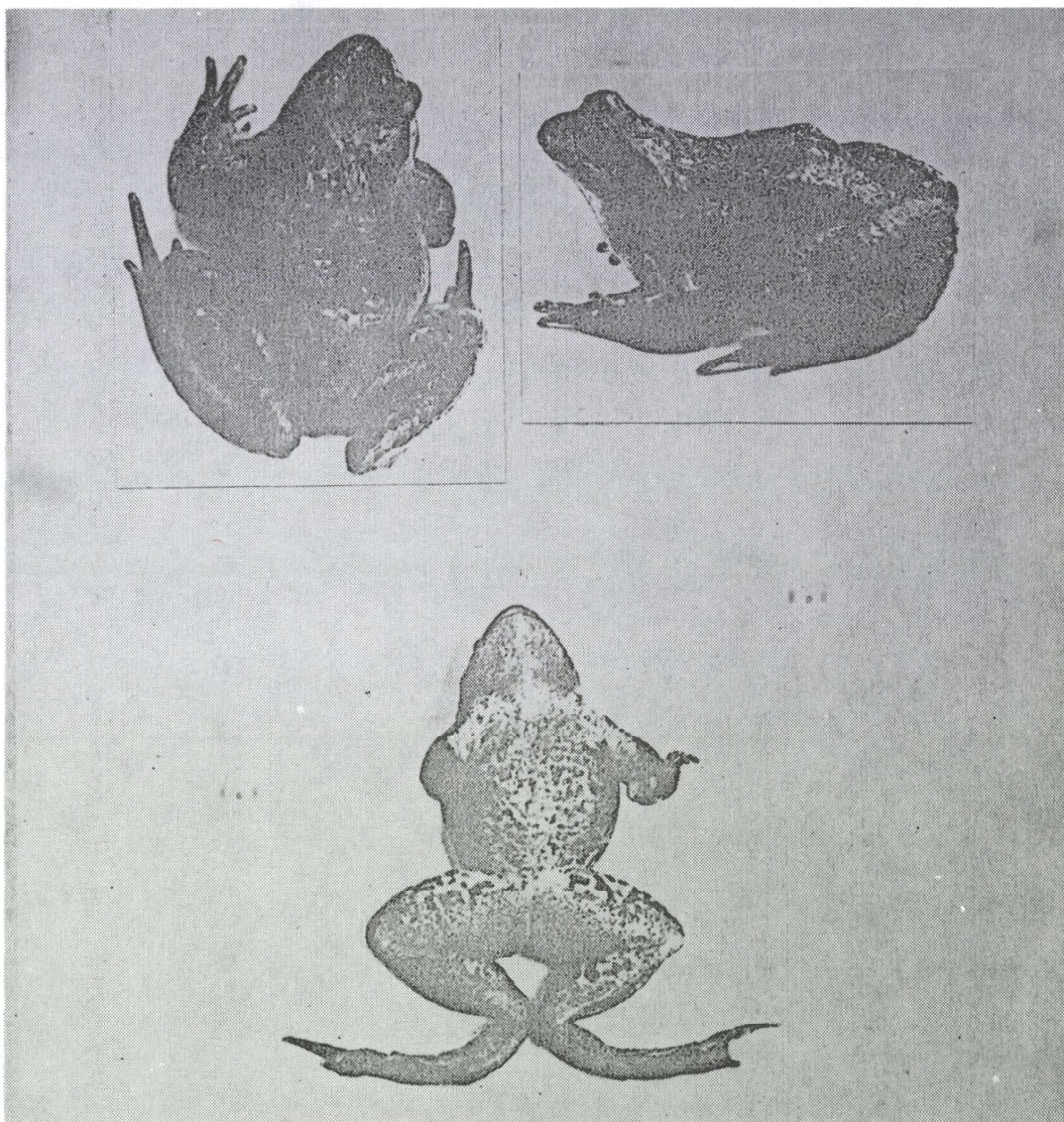
A fenti adatok pontos megjelölésére az egyes kromoszómák karjainak hosszát tárgymikrométerrel bekalibrált okulármikrométerrel megmértük, hosszúságukat mikronokban adtuk meg. A mérési hibák kiküszöbölése céljából a mérőskálákat a kromoszómákkal egyidejűleg lefényképeztük, a papírkép készítésénél pedig a kromoszómákkal azonos nagyítást készítettünk róluk.

Mindkét fajnál 10–10, a középső metafázisban levő garnitúrát vizsgáltunk, hímeket és nőstényeket egyaránt. A kapott mérési eredményeket átlagoltuk, és ezt az átlagértéket fogadtuk el az adott fajra jellemzőnek.

### *Rana temporaria* LINNÉ – Gyepi béka

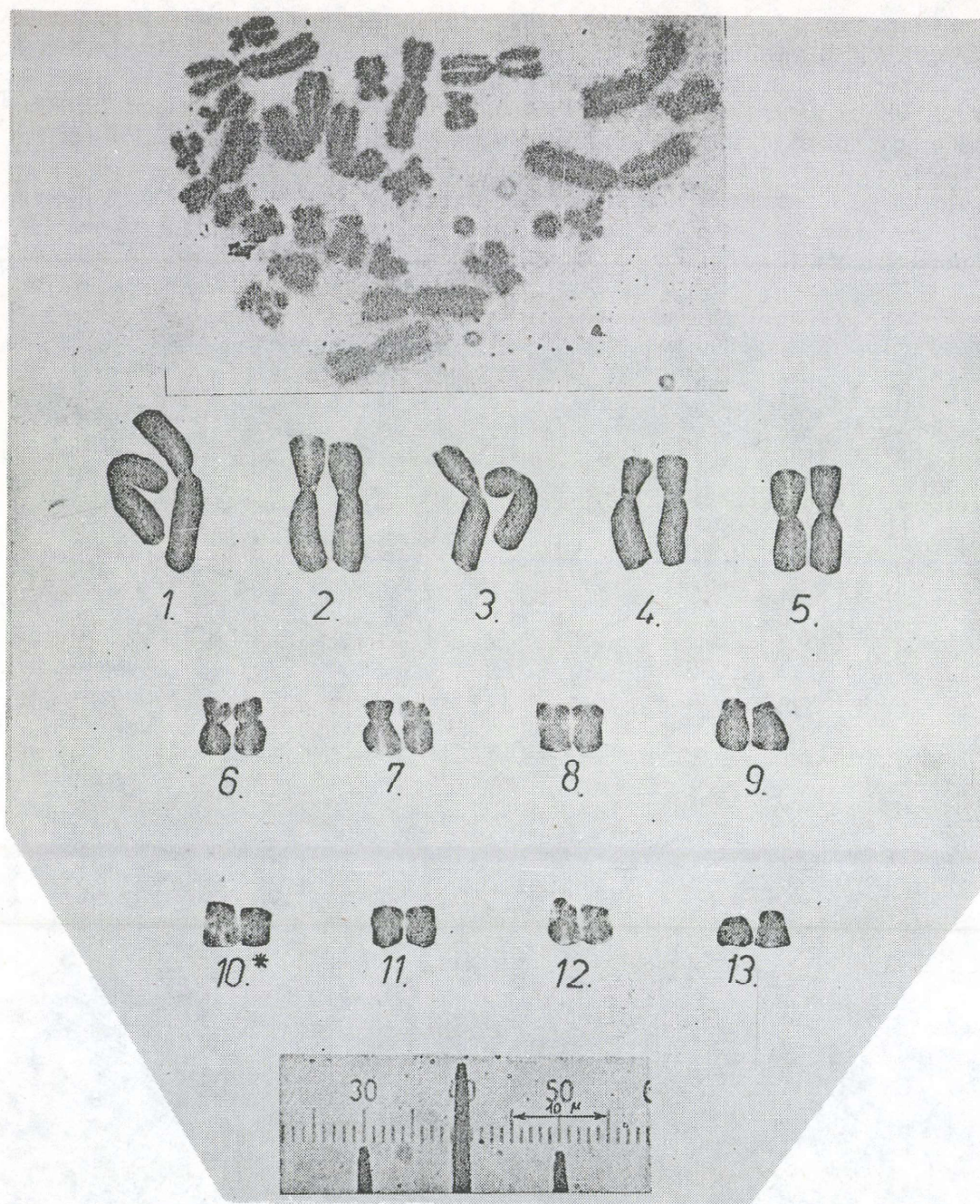
Testhossza 50–80 mm, zömök felépítésű. Feje szélesebb, mint amilyen hosszú, orrcsúcsa tompán lekerekített. Dobhártyája körül sötét, háromszögre emlékeztető folt található. A hímnek két belső hanghólyagja van. Hátoldalának színe barnás árnyalatú,

sötétbarna vagy feketés foltokkal. A gerincoszlop mentén fordított V-alakú rajzolat látható. Hasoldala sárgásfehér vagy világossárga, torka halványkékes színű. Hátsó végtagjain haránt irányban sötét sávozás látható, ha a combokat a test hossz tengelyére merőlegesen állítjuk, a sarkok összeérnek. Közép- és Észak-Európában, valamint Japánban honos, hazánkban inkább a 600 m feletti magasságokban fordul elő. A vizet főleg párzási időben keresi fel, általában nedves talajú erdőkben, források, patakok és tavak környékén tartózkodik. A felhasznált állatokat az Eger mellett levő felsőtárkányi tóból gyűjtöttük be. Fenotípusos megjelenésüket, valamint kariogramjukat és az idiogramjukat a mellékelt fotóábrák mutatják:



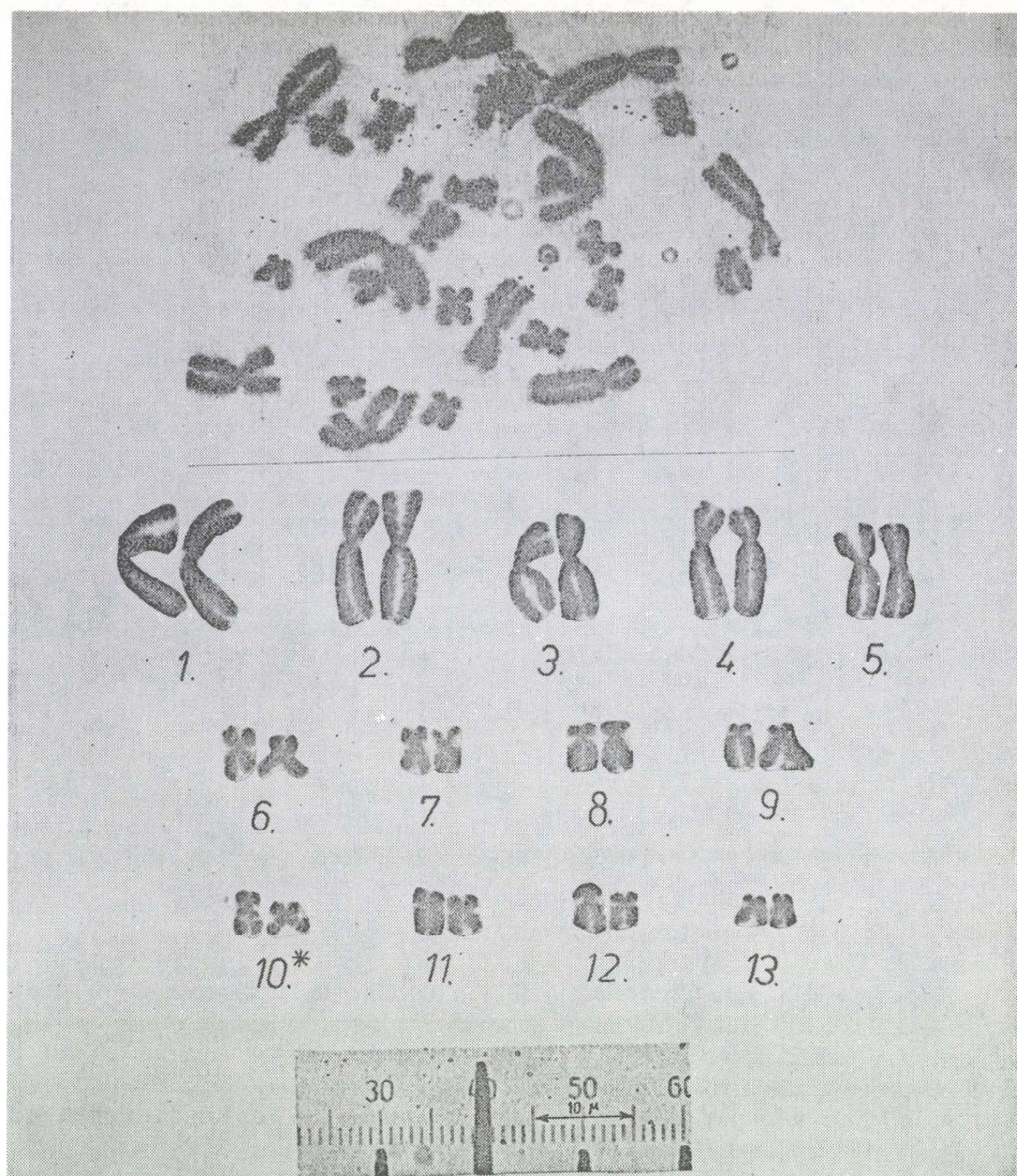
1. ábra. *Rana temporaria*





2. ábra. *Rana temporaria* (hím)





3. ábra. *Rana temporaria* (nőstény)

Diploid kromoszómaszáma már a korábbi szerzők (WITSCHI 1924; MAKINO 1932; WICKBOM 1945; WITSCHI, KODAN és MAKINO 1958) leírásaiban is  $2n = 26$ -nak adódott. Megerősíti ezt ULLERICH (1967) is, annak ellenére, hogy vizsgálatai során számfeletti kromoszómát talált a Tübingen környéki populációban, ezt azonban mi nem észleltük az általunk vizsgált esetek egyikénél sem. A *Rana temporaria* kariotípusára jellemző, hogy 5 nagy és 8 kis pár kromoszómát tartalmaz, meglepően sok a metacentrikusak száma (1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8. és a 11. pár), szubmetacentrikus a 10., 12., 13. pár, a 9. szubtelocentrikus. A 10. kromoszómapár hosszú karján másodlagos befűződés látható. Kromoszómainak átlagos, jellemző értékeit a mellékelt táblázatban tüntettünk fel:

*A Rana temporaria kariotípusának jellemző átlagos értékei*

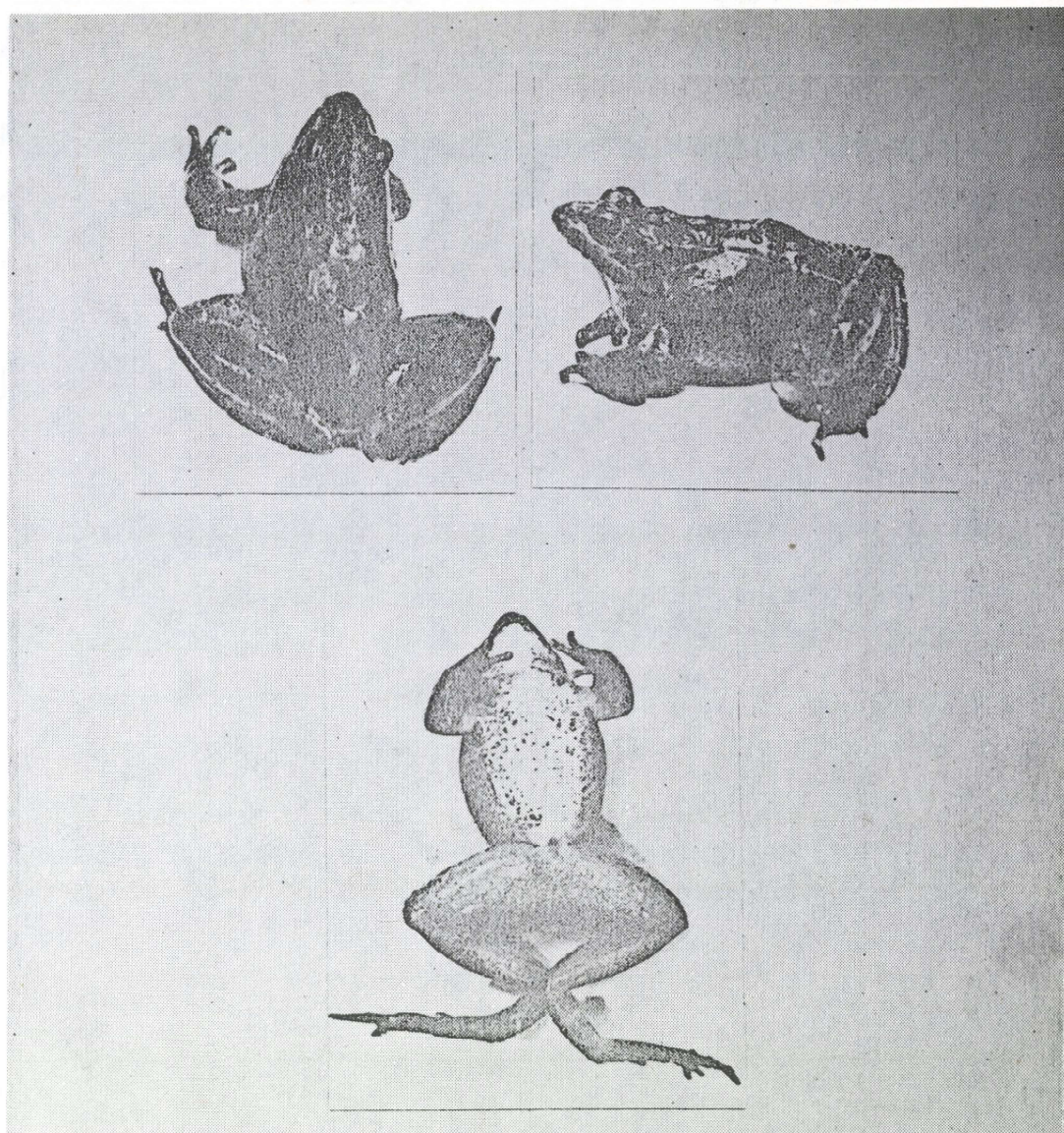
A kromoszómák sorszáma	l	s	c	Relatív hossz %	H/R	ci	Szórás	Típus
1.	9,60	7,84	17,44	17,29	1,22	44,95	0,8208	m
2.	7,89	5,51	13,40	13,35	1,43	40,81	0,7079	m
3.	6,95	5,46	12,41	11,92	1,27	43,99	0,2808	m
4.	6,93	4,56	11,49	11,00	1,51	40,36	0,4383	m
5.	5,97	4,21	10,18	9,92	1,41	41,35	0,5083	m
6.	3,93	2,66	6,59	6,42	1,47	40,36	0,2941	m
7.	3,18	2,14	5,32	5,20	1,48	40,22	0,2472	m
8.	3,05	2,00	5,05	5,11	1,52	39,60	0,2472	m
9.	3,67	1,00	4,67	4,58	3,67	21,41	0,2186	st
10.*	2,88	1,43	4,31	4,17	2,01	33,17	0,1054	sm
11.	2,38	1,42	3,80	3,76	1,67	37,36	0,2666	m
12.	2,31	1,25	3,56	3,56	1,84	35,11	0,2502	sm
13.	2,22	1,13	3,35	3,31	1,96	33,73	0,3350	sm
Összhossz			101,57				1,353	

\* = A 10. kromoszómapár hosszú karján másodlagos befűződés látható.

### *Rana dalmatina* BONAPARTE – Erdei béka

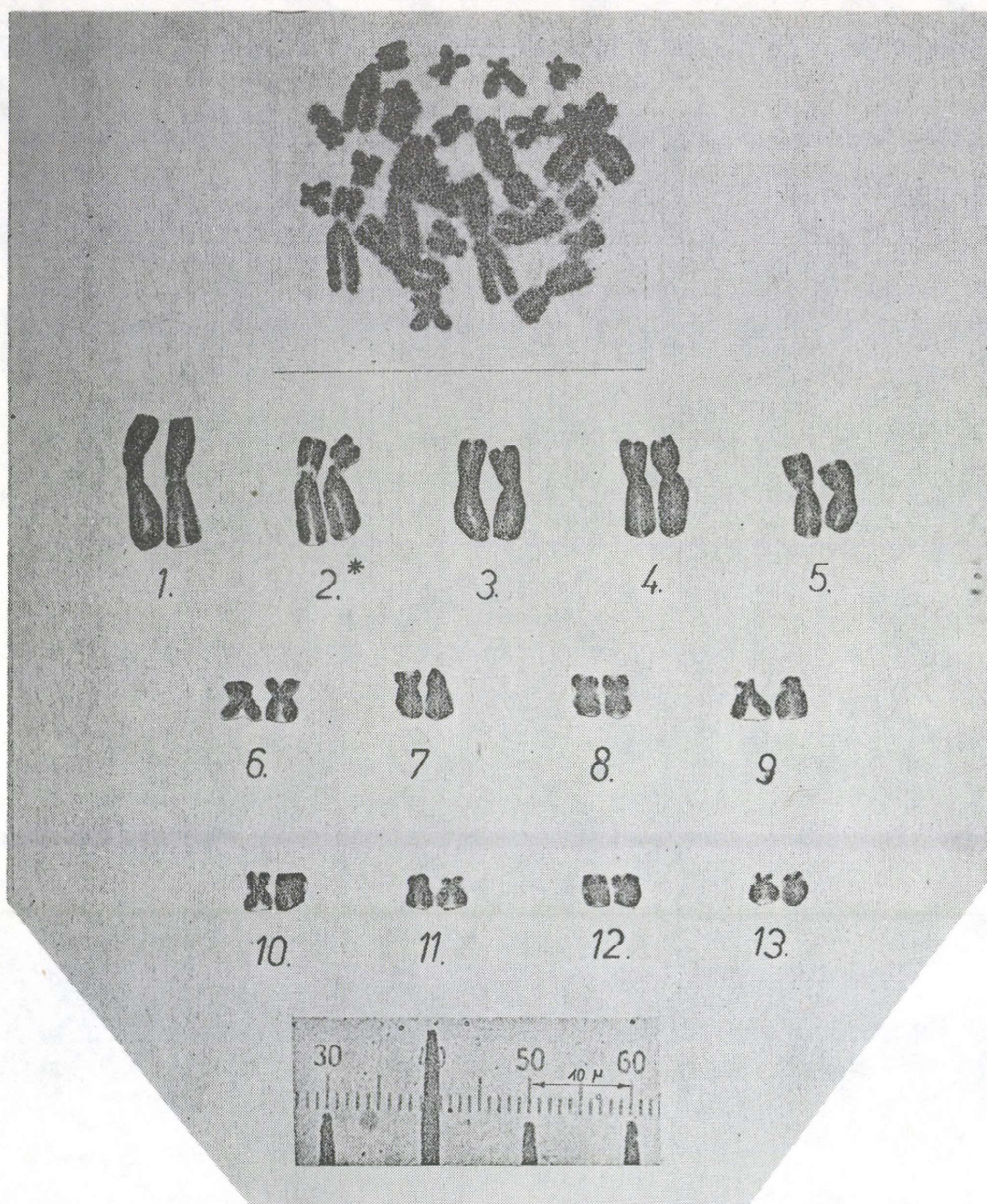
Teste hosszú és karcsú, mérete 45–77 mm. Orra hegyes, dobhártyája körül sötét, háromszög alakú folt látható. A hímnek hanghólyagja nincs, így hangja gyenge. Hátsó végtagja igen hosszú, ha a combokat a test hossz tengelyére merőlegesen állítjuk, a sarkok jóval túlérnek egymáson. Hasoldala egyszínű sárgásfehér, háta és testoldalai sötét egyszínű barnák, de lehetnek homok- vagy rózsaszínes barnák is. A vállak között szintén megvan a fordított V alakú rajzolat. Hátsó lábai harántul sávzottak, hasi oldalán egyszínű sárgásfehérek. Elterjedt egész Közép- és Dél-Európában, kelet felé Iránig hatol. Hazánkban is gyakori, élőhelye megegyezik a *Rana temporaria*éval, sokszor vele azonos helyen található. Fenotípusos megjelenését, kariogramját és idiogramját a mellékelt fényképek mutatják, a felhasznált állatok begyűjtése szintén a felsőtárányi tóból történt.





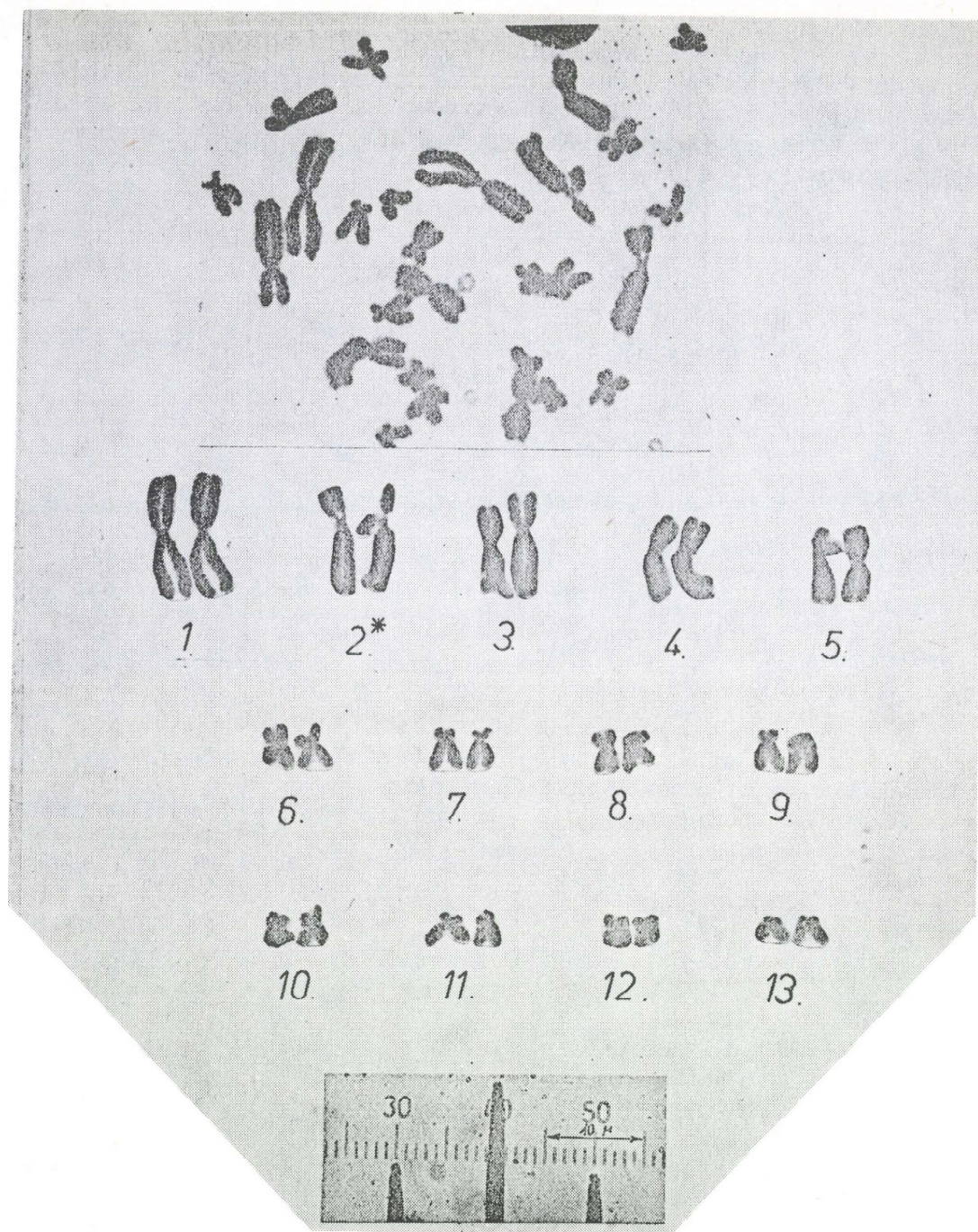
4. ábra. *Rana dalmatina*





5. ábra. *Rana dalmatina* (hím)





6. ábra. *Rana dalmatina* (nőstény)

Diploid kromoszómaszáma  $2n = 26$ . Kromoszómagarnitúrájában 5 nagy és 8 kis pár kromoszóma található. Főleg metacentrikus (1., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12. pár), kisebb számban szubmetacentrikus (2., 7., 11., 13. pár) kromoszómái vannak, a 9. pár szubtelocentrikus. A másodlagos befűződés itt is megtalálható, de a 2. kromoszómapár rövidebb karján, a centromer-régió közelében. Kariotípusának átlagos jellemző értékeit a mellékelt táblázat mutatja:

*A Rana dalmatina kariotípusának jellemző átlagos értékei*

A kromoszómák sorszáma	l	s	c	Relatív hossz %	H/R	ci	Szórás	Típus
1.	7,40	5,67	13,08	11,50	1,30	43,35	0,6288	m
2.*	7,38	4,09	11,48	13,61	1,89	35,65	0,4362	sm
3.	6,52	4,17	10,63	12,60	1,55	39,22	0,5374	m
4.	5,78	4,03	9,81	11,63	1,43	41,08	0,5007	m
5.	4,57	3,65	8,22	9,76	1,25	44,40	0,5923	m
6.	3,09	2,23	5,32	6,30	1,38	41,91	0,5945	m
7.	3,52	1,23	4,77	5,65	2,81	26,20	0,2811	sm
8.	2,78	1,85	4,58	5,43	1,44	40,82	0,3392	m
9.	3,21	0,84	4,05	4,80	3,82	20,74	0,4123	st
10.	2,18	1,57	3,75	4,44	1,38	41,86	0,3800	m
11.	2,12	1,03	3,15	3,73	2,05	32,69	0,3673	sm
12.	1,59	1,36	2,95	3,49	1,16	46,10	0,0614	m
13.	1,74	0,81	2,55	3,02	2,14	31,76	0,2326	sm
Összhossz			84,34				3,975	

\* = a 2. pár kromoszóma rövid karján másodlagos befűződés látható.

A kariotípusok egzaktabb összehasonlítása céljából elvégeztük a két átlagérték eltéréseinek statisztikai próbáját a vizsgált békafajok kromoszómáinak egyes homológ párpai, valamint a kromoszómák összhosszáinak értékei között.

Először kiszámítottuk a szórást vagy standard hibát a következő összefüggés segítségével:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

illetve:

$$s = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n - 1}}$$

ahol:

$x$  = a kísérleti adatok értéke

$\bar{x}$  = a kísérleti adatok átlaga

$n$  = a mérések száma

$n - 1$  = szabadságfok

$\sum x^2$  = az egyes adatok négyzeteinek összege

$(\sum x)^2$  = az egyes adatok összegének négyzete.

A kapott szórás értékeket az előző táblázatokban tüntettük fel. Ezután kiszámoltuk a STUDENT-FISHER-féle  $t$ -eloszlás értékét az alábbi formula szerint:

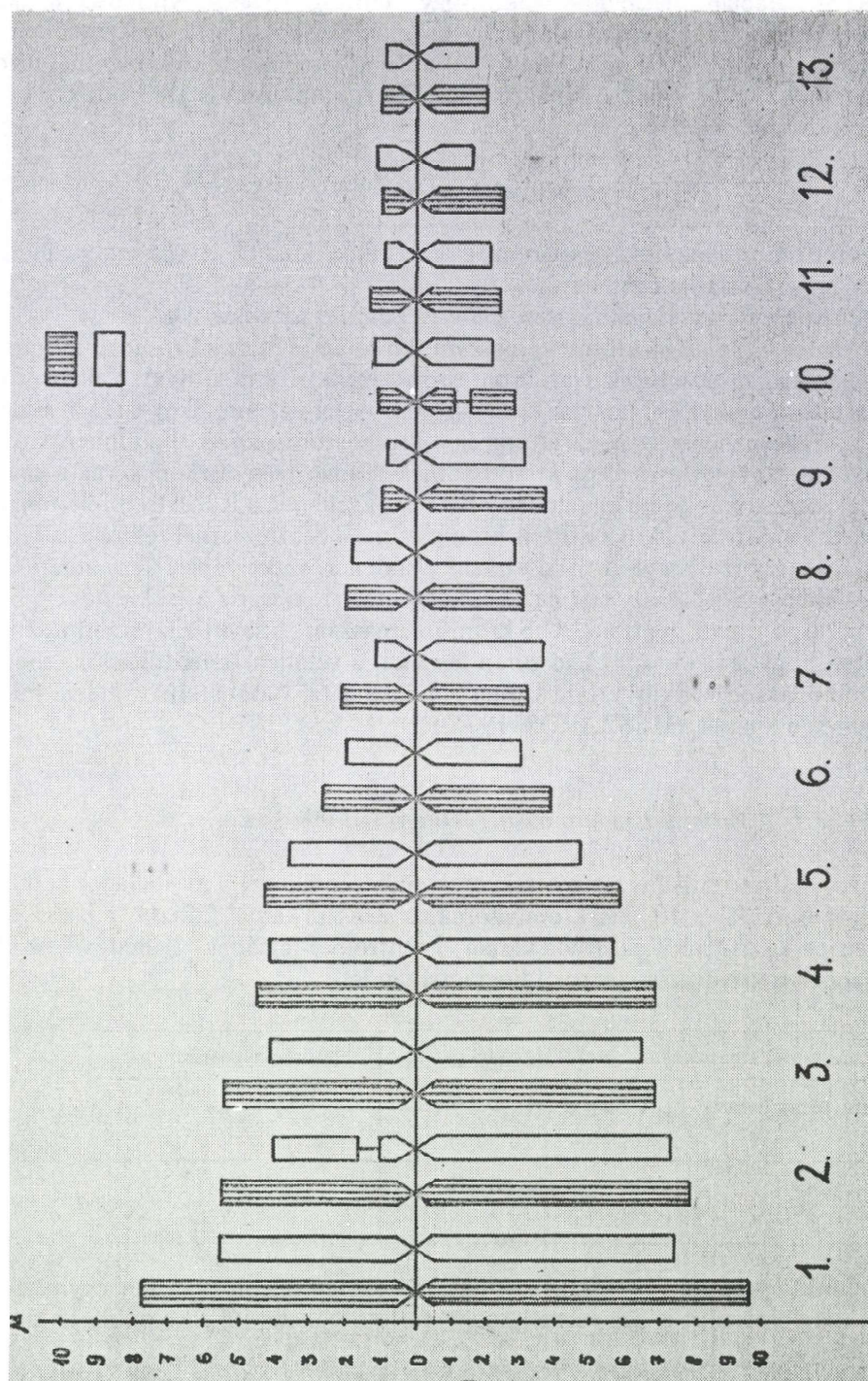
$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}}}{s}$$

ahol:

$\bar{x}_1$  = a *Rana temporaria* kromoszómáinak átlagos hossza

$\bar{x}_2$  = a *Rana dalmatina* kromoszómáinak átlagos hossza





7. ábra. A *Rana temporaria* és a *Rana dalmatina* összehasonlító idiogramja.

$n_1 = 10$  (a mérések száma a *Rana temporaria* esetében)

$n_1 = 10$  (a mérések száma a *Rana dalmatina* esetében)

Számításaink alapján megállapítottuk, hogy a vizsgált fajok kromoszómáinak hosszúságai az egyes homológ párok, valamint a kromoszómák összhosszának esetében is szignifikánsan eltérnek egymástól, a két faj közül a *Rana temporaria* kromoszómái bizonyultak hosszabbnak. A könnyebb összehasonlítás végett grafikusan is ábrázoltuk a kromoszómák teljes hosszát mindkét esetben.

### *Az eredmények kiértékelése*

A kariotípusok meghatározása után megfigyeltük a köztük levő azonos, illetve hasonló sajátosságokat, valamint az eltéréseket.

*A kariotípusokban megtalálható azonos, illetve hasonló sajátosságok.*

Mindkét esetben a diploid kromoszómaszám  $2n = 26$ , a nemek kromoszómagarnitúrájában eltérést nem tapasztaltunk, ivari kromoszóma egyiknél sem látható. Valamennyi kromoszómagarnitúra 5 nagy és 8 kis pár kromoszómát tartalmaz, mindkét esetben észleltük a másodlagos befűződést is a garnitúra egy kromoszómapárján. Feltűnően sok a metacentrikus és a szubmetacentrikus kromoszómák száma, elenyészően kevés a szubtelocentrikus, akrocentrikus pedig egyáltalán nincs. Ez a jelenség a Robertson-féle transzlokációkkal értelmezhető: két akrocentrikus kromoszóma a centromernél fuzionál, ezáltal metacentrikussá, illetve szubmetacentrikussá válik. Ennek következtében a kromoszómaszám csökken, s ezzel együtt az egy sejtmagra eső DNS-tartalom is. Ez a csökkenés egyben az evolúció irányát is jelenti, mert a kisebb kromoszómaszám elősegíti a faj stabilitásának növelését azáltal, hogy a DNS-replikáció során leszűkül a véletlen transzlokációk lehetősége. A nagyszámú akrocentrikus kromoszóma fokozza a faj variabilitását, illetve hibás genetikai kópiák képződését. (MÉSZÁROS, 1971.)

### *A kariotípusokban megfigyelhető különbségek*

A hosszúságbeli szignifikáns eltéréseken kívül szembetűnő, hogy a másodlagos befűződés a *Rana temporaria*-nál a 10. kis kromoszómapár hosszú karján látható, a *Rana dalmatina* esetében pedig a 2 nagy pár rövid karján, a centromer-régióban található. További különbségek vannak a kromoszómapárok idiogramjában is:

Kromoszóma típusok	Metacentrikus pár	Szubmetacentrikus pár
<i>Rana temporaria</i>	1., 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 11.	10., 12., 13.
<i>Rana dalmatina</i>	1., 3., 4., 5., 6., 8., 10., 12.	2., 7., 11., 13.

Vizsgálataink egyértelműen arra engednek következtetni, hogy a két egymáshoz külső és belső morfológiailag is sok hasonlóságot mutató békafaj jól elkülöníthető kariotípussal rendelkezik.



- BARTOS L. 1978. A *Rana esculenta*-formakör három tipikus alakjának összehasonlító kariológiai vizsgálata, és statisztikai feldolgozása. Doktori értekezés.  
Debrecen, KLTE Állattani Tanszék
- DR. DELY O. GY. 1967; Kétéltűek—Amphibia. Fauna Hungariae XX. kötet, 3. füzet  
Budapest, Akadémiai Kiadó.
- FISHER—YATES 1963; Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. (Oliver and Boyd Ltd. Edinburgh 6. kiadás.)
- GUILLEMIN C. 1967; Caryotypes de *Rana temporaria* (L) et de *Rana dalmatina* (Bonaparte).  
Chromosoma (Berl.) 21, 189–197.
- HORVÁTH I. 1974; Kvantitatív mikrobiológiai eljárások  
Biológiai Tanulmányok 3.  
Budapest, Akadémiai Kiadó.
- LEVAN A., FREDGA K. and SANDBERG A. A. 1964; Nomenclature for centromeric position of chromosomes Hereditas 52: 201–220.
- MÉSZÁROS B.—BARTOS L. 1978; A *Rana esculenta*-formakör három magyarországi alakjának kariológiai feldolgozása. Acta Biol. Debrecina 15.  
Debrecen, Hungaria.
- MÉSZÁROS B. 1972–73; Nyolc magyarországi Anura-faj kariotípusainak kritikai analízise és a rend evolúciójának néhány kérdése. Acta Biologica Debrecina X–XI.  
Debrecen, Hungaria
- MÉSZÁROS B. 1972; A kromoszómák metrikus feldolgozásának alkalmazásáról néhány Anura-faj rokon kapcsolatának kutatásában. Studia Universitatis Scientiarum Agriculturae Debreceniensis, tom. XVIII.
- MÉSZÁROS B.—V. SZ. KATÓ I. 1976; A halak evolúciója a kariológia tükrében. Acta Biologica Debrecina 13.  
Debrecen, Hungaria
- DR. SELLYEI M. 1976; A kromoszómák morfológiája.  
A biológia aktuális problémái 8. Budapest, Medicina
- ULLERICH F. H. 1967; Weitere Untersuchungen über Chromosomenverhältnisse und DNS-Gehalt bei Anuren. (Amphibia)  
Chromosome 21. Berlin.

#### A COMPARATIVE KARYOLOGIC EXAMINATION OF *RANA TEMPORARIA* LINNÉ AND *RANA DALMATINA* BONAPARTE

This paper describes our comparative karyologic examination of two well-known native frog species, that of *Rana temporaria* LINNÉ and *Rana dalmatina* BONAPARTE. The chromosomes had been prepared for a microscopic examination by the same method, then the preparations were photographed. We determined the characteristic parameters of the chromosomes that are given in Tables. We also made a statistical comparison of the full chromosome lengths given in micrometer.

The chromosomes of *Rana temporaria* were found to be significantly longer. We also observed that the two frog species had different karyotype even in spite of their having more similar inner and outer characteristics.